





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Mi basah	1
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	2
5 Klasifikasi.....	2
6 Syarat mutu	2
7 Pengambilan contoh	3
8 Cara uji	3
9 Syarat lulus uji	4
10 Higiene.....	4
11 Pengemasan.....	4
12 Syarat penandaan	4
Lampiran A	5
Bibliografi	34
Tabel 1 - Syarat mutu mi basah.....	2

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Mi basah* ini merupakan revisi dari SNI 01-2987-1992, *Mi basah*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
2. Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
3. Melindungi kesehatan dan kepentingan konsumen;
4. Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
5. Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri mi.

Perubahan yang terjadi pada standar ini adalah:

1. Penambahan proses produksi pada istilah dan definisi;
2. Penambahan pasal komposisi;
3. Penambahan pasal klasifikasi;
4. Penambahan kriteria uji abu tidak larut dalam asam, mikotoksin deoksinivalenol dan penyesuaian nilai dan kriteria uji cemaran logam dan cemaran mikroba sesuai dengan ketentuan yang berlaku pada syarat mutu.
5. Penghilangan kriteria uji abu dan boraks.
6. Penyesuaian metode uji mengacu standar terkini

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.
5. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
7. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033/2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK. 00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh **Komite Teknis 67-04, Makanan dan Minuman**, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 April 2014 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Badan Pengawas Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 16 Februari 2015 dengan perpanjangan satu bulan sampai dengan tanggal 14 Mei 2015 dengan hasil akhir RASNI.

Mi basah

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji mi basah mentah dan mi basah matang.

2 Acuan normatif

Acuan berikut merupakan bagian tidak terpisahkan untuk penggunaan standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang diacu digunakan. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amandemen) digunakan.

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 6887-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1: Aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal*.

SNI ISO 6887-4, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*.

SNI ISO 6888-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Motoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1: Teknik menggunakan media Baird-Parker agar..*

SNI ISO 7251, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik angka paling mungkin (APM)*.

SNI ISO 7932, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi Bacillus cereus terduga – Teknik penghitungan koloni pada temperatur 30°C*.

SNI ISO 21527-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 1: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air lebih besar dari 0,95*.

3 Istilah dan definisi

3.1

mi basah

produk pangan yang dibuat dari bahan baku utama tepung terigu dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan, yang diperoleh melalui proses pencampuran, pengadukan, pencetakan lembaran (*sheeting*), pembuatan untaian (*slitting*), pemotongan (*cutting*) berbentuk khas mi dengan atau tanpa mengalami proses pemasakan (perebusan atau pengukusan)

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Tepung terigu.

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang sesuai untuk mi basah.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk mi basah sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Klasifikasi

a. Mi basah mentah

Mi basah yang belum mengalami proses perebusan atau pengukusan

b. Mi basah matang

Mi basah yang telah mengalami proses perebusan atau pengukusan

6 Syarat mutu

Syarat mutu mi basah sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu mi basah

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Mi basah mentah	Mi basah matang
1	Keadaan			
1.1	Bau	-	normal	normal
1.2	Rasa	-	normal	normal
1.3	Warna	-	normal	normal
1.4	Tekstur	-	normal	normal
2	Kadar air	fraksi massa, %	maks. 35	maks. 65
3	Kadar protein (N x 6,25)	fraksi massa, %	min. 9,0	min. 6,0
4	Kadar abu tidak larut dalam asam	fraksi massa, %	maks. 0,05	maks. 0,05

Tabel 1 – Syarat mutu mi basah (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Mi basah mentah	Mi basah matang
5	Bahan berbahaya			
5.1	Formalin (HCHO)	-	tidak boleh ada	tidak boleh ada
5.2	Asam borat (H ₃ BO ₃)	-	tidak boleh ada	tidak boleh ada
6	Cemaran logam			
6.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0	maks. 1,0
6.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2	maks. 0,2
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0	maks. 40,0
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,05	maks. 0,05
7	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5	maks. 0,5
8	Cemaran mikroba			
8.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1 x 10 ⁶	maks. 1 x 10 ⁶
8.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	maks. 10	maks. 10
8.3	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/25 g	negatif/25 g
8.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1 x 10 ³	maks. 1 x 10 ³
8.5	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. 1 x 10 ³	maks. 1 x 10 ³
8.6	Kapang	koloni/g	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴
9	Deoksinivalenol	µg/kg	maks. 750	maks. 750

7 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

8 Cara uji

Cara uji untuk mi basah seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
 - Cara uji tekstur sesuai Lampiran A.2.4

- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar abu tidak larut asam sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji bahan berbahaya sesuai Lampiran A.6
 - Cara uji formalin sesuai Lampiran A.6.1
 - Cara uji asam borat sesuai Lampiran A.6.2
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- h) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A. 8
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.9.1; SNI ISO 6887-1 dan SNI ISO 6887-4,
 - Cara uji Angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2
Cara uji *Escherichia coli* sesuai dengan SNI ISO 7251
 - Cara uji *Salmonella* sp sesuai Lampiran A.9.3
Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai dengan SNI ISO 6888-1
Cara uji *Bacillus cereus* sesuai dengan SNI ISO 7932
Cara uji kapang sesuai dengan SNI ISO 21527-1.
- j) Cara uji deoksinivalenol sesuai Lampiran A.10.

9 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

10 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku .

11 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

12 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Label dan Iklan Pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji mi basah

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji keadaan, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji keadaan dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji keadaan

Buka kemasan contoh mi basah dan ambil contoh 100 g, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh mi basah dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh mi basah dan ambil contoh sebanyak 400 g secara aseptik, kemudian tempatkan dalam wadah steril.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian keadaan.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh dengan indra penglihat (mata) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) lihat warna contoh uji;
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat warna sesuai dengan yang tercantum dalam label maka hasil dinyatakan "normal";
- b) jika terlihat warna lain selain warna yang tercantum dalam label maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.4 Tekstur

A.2.4.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera peraba yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

A.2.4.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui teksturnya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.4.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tekstur terasa normal, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) Jika tekstur tidak normal, maka disebutkan tekstur yang diamati.

A.3 Kadar air

A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada temperatur $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- Oven;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- desikator; dan
- cawan alumunium bertutup dengan diameter 40 mm sampai dengan 50 mm.

A.3.3 Cara kerja

- Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada temperatur $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- masukkan 2 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan di samping cawan di dalam oven pada temperatur $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 (satu) jam setelah temperatur oven $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$;
- tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga temperaturnya sama dengan temperatur ruang kemudian timbang (W_2);
- lakukan sampai bobot konstan;
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 2% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 2 %, maka uji harus diulang kembali.

A.4 Kadar protein ($N \times 6,25$)

A.4.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebagai katalis dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH . NH_3 yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan

ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

A.4.2 Peralatan

- Alat destilasi *Kjeldhal* konvensional atau otomatis;
- alat destruksi;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- pemanas listrik; dan
- buret 10 mL.

A.4.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 ;
- larutan katalis tembaga, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bebas nitrogen 0,05 g/mL H_2O ;
larutkan 5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan air suling menjadi 100 mL, lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas.
- katalis selen;
campurkan 4 g serbuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 anhidrat dan 30 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
- larutan indikator *methyl red* (MR) dan *bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Larutkan 1 g *bromocresol green* dengan etanol 95% menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas.
- larutan asam borat, H_3BO_3 4%;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1 000 mL dan tambahkan 3 mL larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan natrium hidroksida, NaOH 30%;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2 000 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %; dan
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 %, dan encerkan menjadi 100 mL.
- larutan asam klorida, HCl 0,1 N.
pipet dengan hati-hati 8,60 mL HCl pekat (36,5 % sampai dengan 38 %) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan tentukan normalitasnya.

A.4.4 Cara kerja

- Timbang 1 g contoh ke dalam labu *Kjeldahl* (W), tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 mL larutan katalis $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL H_2SO_4 pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit penghisapan asap;
- biarkan dingin, lalu encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 mL larutan NaOH 30% (periksa dengan indikator PP sehingga larutan menjadi basa);
- sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampungan destilat adalah 50 mL larutan H_3BO_3 4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 N (V_1); dan
- kerjakan penetapan blanko (V_2).

A.4.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100\%}{W}$$

Keterangan:

- V_1 adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 V_2 adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N adalah normalitas larutan HCl, dinyatakan dalam Normalitas (N);
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
 6,25 adalah faktor konversi untuk protein.

A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Abu tidak larut dalam asam

A.5.1 Prinsip

Bagian abu yang tidak larut dalam asam

A.5.2 Peralatan

- Tanur;
- pemanas listrik;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- desikator;
- cawan porselen/kuarsa volume 30 mL hingga 50 mL;
- penangas air; dan
- kertas saring tak berabu (*Whatman* No. 40 atau dengan yang setara).

A.5.3 Pereaksi

Larutan asam klorida, HCl pekat.

A.5.4 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada temperatur $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator sehingga temperaturnya sama dengan temperatur ruang kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- masukkan 3 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut pada pemanas listrik hingga menjadi arang, kemudian tempatkan dalam tanur pada temperatur $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- larutkan abu dengan menambahkan 5 mL HCl pekat;
- panaskan sampai mendidih, lalu uapkan campuran sampai kering di atas penangas air;
- lanjutkan pemanasan residu yang diperoleh pada butir (d) di atas penangas air selama 30 menit;
- tambahkan 5 mL HCl pekat terhadap residu yang diperoleh pada butir (e) dan panaskan sampai mendidih. Lalu tambahkan 20 mL air suling dan panaskan;
- saring larutan dengan kertas saring tak berabu (*Whatman* No. 40 atau dengan yang setara) dan cuci dengan 150 mL air suling panas sampai bebas klorida;
- masukkan kertas saring ke dalam cawan porselen atau kuarsa yang telah diketahui bobotnya keringkan dalam tanur $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;

- i) pindahkan segera ke dalam desikator sehingga temperaturnya sama dengan temperatur ruang kemudian timbang (W_2). Penimbangan diulangi sampai bobot tetap.

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar abu tidak larut dalam asam (\%)} = \frac{(W_2 - W_0)}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dalam g;

W_1 adalah bobot cawan + contoh sebelum diabukan;

W_2 adalah bobot cawan + abu setelah ditambahkan asam, disaring dan dipanaskan.

A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5% dari nilai rata-rata hasil abu tidak larut dalam asam. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Bahan berbahaya

A.6.1 Formalin

A.6.1.1 Prinsip

Adanya formalin (HCHO) ditunjukkan dengan munculnya warna ungu muda sampai ungu tua, setelah contoh yang telah disuling dalam keadaan asam direaksikan dengan larutan jenuh *1,8-dihydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid*

A.6.1.2 Peralatan

- Alat penyulingan;
- penangas air;
- labu *Kjeldahl* 800 mL; dan
- mortar.

A.6.1.3 Pereaksi

- Asam fosfat, H_3PO_4 ;
- asam sulfat, H_2SO_4 ;
- larutan jenuh *1,8-dihydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid* (ca 500 mg/100 mL) di dalam 72% H_2SO_4 (tuangkan 150 mL H_2SO_4 ke dalam 100 mL H_2O dan dinginkan. Larutan berwarna kekuning-kuningan).

A.6.1.4 Cara kerja

- Persiapan larutan uji;
maserasi/ basahi 100 g contoh dengan 100 mL H_2O dalam mortar. Pindahkan ke dalam labu *Kjeldahl* 800 mL, asamkan dengan H_3PO_4 , tambahkan 1 mL berlebih. hubungkan dengan pendingin melalui perangkap dan secara perlahan suling 50 mL.
- letakkan 5 mL pereaksi (larutan jenuh *1,8-dihydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid*) di dalam tabung reaksi dan sambil diaduk tambahkan 1 mL hasil penyulingan yang diperoleh dari a);
- letakkan dalam penangas air mendidih selama 15 menit, dan amati selama waktu pemanasan;

- d) adanya formalin (HCHO) ditunjukkan dengan munculnya warna ungu muda sampai ungu tua. (intensitas warna tergantung pada jumlah HCHO yang ada).

A.6.2 Asam borat

A.6.2.1 Prinsip

Adanya asam borat (H_3BO_3), ditunjukkan dengan perubahan warna merah khas pada *turmeric paper*, setelah *turmeric paper* direndam dalam contoh yang telah diasamkan.

A.6.2.2 Peralatan

- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- Erlenmeyer* 250 mL bertutup kaca;
- cawan Petri;
- kertas *Whatman* no. 2 atau dengan yang setara;
- kertas saring (*Whatman* no. 40 atau dengan yang setara).

A.6.2.3 Pereaksi

- Asam klorida, HCl;
- alkohol 80%;
- Turmeric paper*,
 - Tambahkan 100 mL alkohol 80% pada 1,5 g sampai 3,0 g *Turmeric powder* dalam *Erlenmeyer* 250 mL bertutup kaca;
 - kocok 5 menit dan saring;
 - celupkan lembar kertas *Whatman* No. 2 ke dalam filtrat yang jernih dalam cawan Petri; tunggu kertas sampai kering;
 - setelah 1 jam potong menjadi 6 × 1 cm potongan dan simpan dalam wadah bertutup rapat terlindung dari cahaya;
- amonium hidroksida, NH_4OH .

A.6.2.4 Cara kerja

- Timbang 100 g contoh, lalu tambahkan air secukupnya dan panaskan sampai contoh cukup cair;
- asamkan contoh uji dengan HCl (7 mL asam untuk setiap 100 mL contoh uji);
- rendam *turmeric paper* dalam cairan yang diasamkan dan biarkan kertas kering secara spontan;
- jika terdapat boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) atau asam borat (H_3BO_3), kertas berubah menjadi merah khas.

A.7 Cemarkan logam

A.7.1 Timbal (Pb) dan kadmium (Cd)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada temperatur 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimum 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) (sebaiknya menggunakan SSA atau *grafit furnace*);
- b) tanur;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) penangas air;
- f) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
- g) labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- h) gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) gelas piala 250 mL;
- j) botol polipropilen;
- k) cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 μm sampai dengan 25 μm .

A.7.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) asam klorida, HCl pekat;
- c) larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- g) larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.
- h) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- i) larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- j) larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- k) larutan baku kerja Cd.

pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.

A.7.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa (W);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur pada temperatur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada temperatur (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling, jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol polipropilen;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran *Relative Standard Deviation* (RSD) dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.2 Timah (Sn)

A.7.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.7.2.2 Peralatan

- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn);
- tanur;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- pemanas listrik;
- penangas air;
- labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL;
- pipet ukur berskala 0,1 mL;
- Erlenmeyer* 250 mL;
- gelas ukur 50 mL; dan
- gelas piala 250 mL.

A.7.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K; larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- asam nitrat, HNO_3 pekat;
- asam klorida, HCl pekat;
- larutan baku 1 000 mg/mL Sn; dan larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada temperatur ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku kerja Sn.
Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 mg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.7.2.4 Cara kerja

- Timbang contoh 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam *Erlenmeyer* 250 mL, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat *Erlenmeyer* dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas *Erlenmeyer* tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl , dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;

- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.3 Merkuri (Hg)

A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.7.3.2 Peralatan

- a) SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG);
- b) *microwave digester*;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) tabung destruksi;
- g) labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL;
- i) gelas ukur 25 mL;
- j) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret; dan
- k) gelas piala 500 mL.

A.7.3.3 Bahan dan pereaksi

- a) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);

- d) hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- e) larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 %;
- f) larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai temperatur ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 tambahkan mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
- l) batu didih.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin,
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai temperatur ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;

- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemarkan Arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.8.2 Peralatan

- a) SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG);
- b) tanur;

- c) *microwave digester*;
- d) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) pemanas listrik;
- f) *Bunsen Burner*;
- g) labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- i) labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- j) gelas ukur 25 mL;
- k) pipet volumetrik 25 mL;
- l) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
- m) cawan porselen kapasitas 50 mL; dan
- n) gelas piala 200 mL.

A.8.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- c) asam perklorat, HClO_4 pekat;
- d) ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- f) larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis ke dalam labu ukur 500 mL.
- g) larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling.
- k) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) larutan baku kerja As.
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) kedalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan maksimum 2 menit;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan temperatur 450°C (± 1 jam);
- dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan maksimum 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan bunsen Burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.

A.8.6 Ketelitian

RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka lempeng total

A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.9.1.2 Peralatan

- Blender peristaltik (*stomacher*) dengan kantong plastik steril atau homogenizer berputar (blender) dengan kecepatan tidak tetap antara 8 000 r/min dan 45 000 r/min;
- autoklaf;
- neraca kapasitas 2 000 g dengan ketelitian 0,1 g;
- pemanas listrik;
- labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- gelas piala steril;
- Erlenmeyer* steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL, dilengkapi dengan *bulb pipettor*;
- tabung reaksi; dan
- sendok, gunting, dan spatula steril.

A.9.1.3 Larutan pengencer untuk Angka lempeng total

Buffered peptone water (BPW)

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

A.9.1.4 Homogenisasi contoh untuk Angka lempeng total

- Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.9.2 Angka lempeng total

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada temperatur $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.9.2.2 Peralatan

- Inkubator $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- oven/alat sterilisasi kering;
- autoklaf;
- penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- alat penghitung koloni;
- botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor*; dan
- cawan Petri gelas/plastik (berukuran maksimum 15 mm x 90 mm), steril.

A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer

- Buffered peptone water* (BPW)

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada temperatur $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

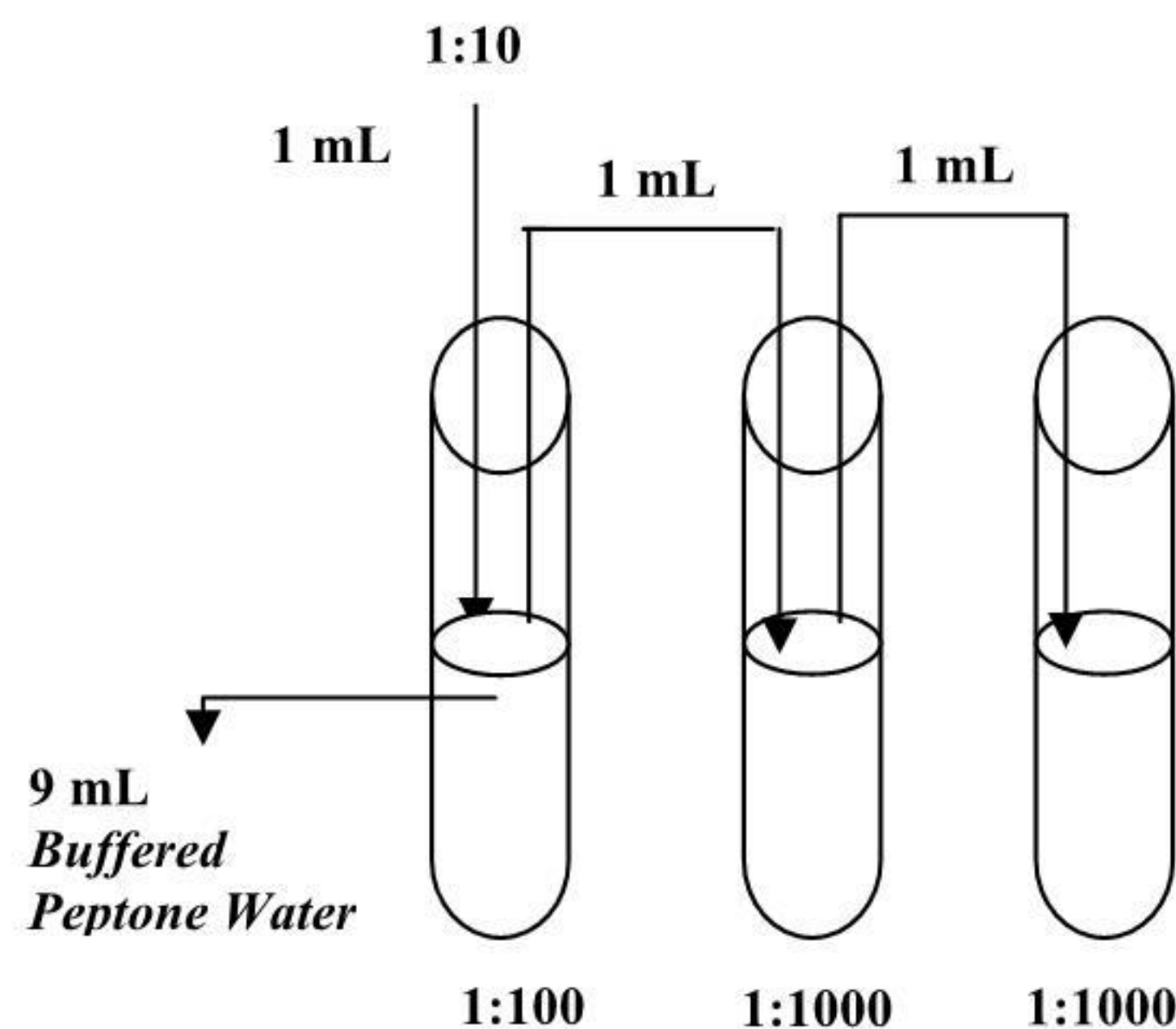
- Plate count agar* (PCA)

- Yeast extract	2,5 g
- Pancreatic digest of caseine	5 g
- Glukosa	1 g
- Agar	15 sampai dengan 20 g
- Air suling	1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.9.2.4 Cara kerja

- Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.



Gambar A.1- Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW).

- pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran $10^{-1} - 10^{-4}$ atau sesuai keperluan ke dalam cawan Petri steril secara duplo;
- ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bertemperatur $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama;
- goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku;
- masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada temperatur $30 ^\circ\text{C}$ selama 72 jam;
- catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam;
- hitung angka lempeng total dalam 1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

A.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.9.2.6 Pernyataan hasil

A.9.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;
 n_1 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;
d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
– jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
f) menghitung koloni yang merambat;
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
– perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;

- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

- g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan Petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah (<10).

A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.9.3 *Salmonella* sp

A.9.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pra pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media pengkayaan, dan kemudian dilanjutkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.9.3.2 Peralatan

- Inkubator (37 ± 1) °C;
- autoklaf;
- oven;
- neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($41,5 \pm 1$) °C;
- penangas air bertemperatur (37 ± 1) °C;
- pH meter;
- blender dan *blender jar* (botol) steril;
- botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- cawan Petri steril, 15 mm x 100 mm, kaca atau plastik;
- pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;

- p) jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) jarum Ose yang berujung runcing;
- r) tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 mm x 150 mm dan 20 mm x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) botol pengencer 500 mL;
- t) rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *vortex mixer*;
- v) lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.9.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) media *Rappaport-Vassiliadis* (RVS) (media RVS harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut). Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTn) *broth*;
- d) *xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) urea agar;
- i) *lysine decarboxylase broth* (LDB);
- j) larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- k) toluene;
- l) kertas cakram, β -galaktosidase;
- m) media *Voges-Proskauer* (VP);
- n) pereaksi uji *Voges-Proskauer* (VP);
- o) larutan *creatine*;
- p) 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) larutan potasium hidroksida (KOH), 40 %;
- r) *tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- s) pereaksi Kovacs;
- t) *semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) *antiserum*; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

A.9.3.4 Cara kerja

A.9.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada temperatur (37 ± 1) °C selama (18 ± 2) jam.

A.9.3.4.2 Pengkayaan

- a) Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media RVS dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL MKTn *broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan

- b) inkubasikan media RVS pada temperatur $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam dalam penangas air bersirkulasi dan MKTTn *broth* pada $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam.

A.9.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan MKTTn *broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada temperatur ruang sampai siap digores;
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RVS;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 3) jam pada temperatur $37 ^\circ\text{C}$;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 3) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 3) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
- XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.
Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media;
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 3) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 3) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut.

A.9.3.4.4 Uji penegasan

A.9.3.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan

- a) Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- b) goreskan masing-masing koloni tersebut pada cawan yang berisi NA yang akan ditumbuhkan oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada temperatur $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- c) gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

A.9.3.4.4.2 Uji penegasan biokimia

- a) Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dari A.9.3.4.4.1.c dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;
- b) inkubasi agar miring TSI pada temperatur $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut:
- a) bagian tegak:
- | | |
|------------------------------|----------------------------------|
| kuning | glukosa positif |
| merah atau tak berubah warna | glukosa negatif |
| hitam | pembentukan H_2S |
| gelembung atau retak | pembentukan gas dari glukosa |

- #### A.9.3.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

© BSN 2015

Tabel A.1 – Interpretasi hasil uji biokimia

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>S. paratyphi C</i>		Galur lain	
	Reaksi	% ^a	Reaksi	% ^a	Reaksi	% ^b	Reaksi	% ^b	Reaksi	% ^a
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- ^c	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H ₂ S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi β -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 ^d
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1

CATATAN:

^a Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe *Salmonella* menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari *food poisoning serotype* dari lokasi yang berbeda

^b Persentase tidak diketahui dari literatur

^c *Salmonella Typhi* bersifat anaerogenikan

^d *Salmonella enterica* spp. *arizonae* memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada β -galactosidase.

A.9.3.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh dari A.9.3.4.4.1.c dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

A.9.3.4.4.4.1 Penghilangan galur auto-aglutinasi

- Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 % pada gelas objek yang bersih;
- suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.9.3.4.4.1.c sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- goyangkan gelas objek selama 30 detik sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

A.9.3.4.4.4.2 Uji antigen O-

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 %;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji antiserum O- menunjukkan hasil sebagai berikut:
Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.9.3.4.4.4.3 Uji antiserum Vi-

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 %;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum Vi- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji antiserum Vi- menunjukkan hasil sebagai berikut:
Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.9.3.4.4.4.4 Uji antigen H-

- Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;

- b) inkubasikan media pada temperatur $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- c) dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- d) emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85 % *saline* menggunakan jarum Ose;
- e) tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- f) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- g) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- h) klasifikasi uji antiserum H- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 non spesifik : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji dan pada kontrol *salin*.

A.9.3.4.4.5 Interpretasi hasil uji penegasan

Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.2.

Tabel A.2 – Interpretasi hasil uji penegasan

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Bukan <i>Salmonella</i>
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	

A.9.3.5 Pernyataan hasil

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* pada contoh uji per 25 g .

A.10 Deoksinivalenol

A.10.1 Prinsip

Deoksinivalenol (DON) dipisahkan dengan cara diekstraksi secara selektif dengan kolom, ditetapkan secara Kromatografi Gas (KG).

A.10.2 Peralatan

- a) Kromatografi Gas (KG);
- b) sentrifus;
- c) kolom untuk pencucian larutan uji;
- d) kertas saring standar kromatografi dengan retensi ukuran partikel 20 μm ;
- e) tabung reaksi kaca borosilikat *disposable*, 125 x 1 cm;
- f) *mixer* tabung vorteks; dan
- g) pemanas tabung reaksi.

A.10.3 Pereaksi

- a) Larutan stok DON;
Larutkan 1,0 mg DON dalam 10 mL metanol, simpan dalam freezer, DON dapat terurai kembali dalam metanol setelah 30 hari.
- b) asam heptafluorobutirat anhidrat (AHFBA);
- c) gel silika berukuran 10 μm - 40 μm ;
Panaskan 25 g gel silika pada temperatur 110 °C selama 3 jam, lalu didinginkan pada temperatur ruang dalam desikator, tambahkan 1,5 mL H₂O, kocok sampai sepenuhnya bercampur, dan simpan selama semalam dalam wadah yang kedap udara.
- d) pelarut yaitu metanol, aseton, CH₃CN, toluena, n-heksana, CH₂Cl₂ dan CHCl₃, semua terdetilasi dalam gelas, etanol absolut; dan

CATATAN: CHCl₃ adalah bersifat karsinogenik

- e) katalis 4-Dimetilaminopiridina (4-DMAP) dengan kemurnian minimum 99 %.
Siapkan larutan katalis yang mengandung 2 mg/mL dengan melarutkan 100 mg 4-DMAP dalam 50 mL toluena-CH₃CN (dengan rasio 95:5).

A.10.4 Cara kerja**A.10.4.1 Ekstraksi contoh uji**

- a) Keringkan contoh sampai bisa digerus dan melewati saringan berukuran 2 mm;
- b) timbang 25 g contoh dengan ketelitian 0,01 g;
- c) tambahkan 10 mL H₂O dan 125 mL CHCl₃-etil alkohol dengan rasio 8:2;
- d) kocok selama 60 menit;
- e) saring dengan kertas saring berukuran partikel 20 μm pada kondisi vakum hingga diperoleh filtrat;
- f) ambil 10 mL filtrat dan masukkan ke dalam tabung vial berukuran 15 mL;
- g) pekatkan contoh dengan pemanas tabung reaksi dan gas nitrogen; dan
- h) simpan residu untuk pencucian kolom.

A.10.4.2 Pencucian kolom

- a) Siapkan bubur gel silika dengan mengocok 25 g gel silika dan 10 mL CH₂Cl₂;
- b) masukkan tabung uji yang berukuran 16 x 125 mm ke dalam alat sentrifus;
- c) masukkan kolom ke dalam masing-masing tabung uji tersebut;
- d) pipet bubur gel silika sebanyak 5 mL ke dalam masing-masing kolom yang masih kosong A.10.2.c;
- e) lalu disentrifus dengan kecepatan 1 000 rpm selama 2 menit;
- f) buang cairan yang terkumpul (supernatan) dalam masing-masing tabung uji;
- g) larutkan residu (pelet) dengan 3 mL CH₂Cl₂, dalam tabung pencampur dan divorteks, lalu pindahkan ke dalam kolom;
- h) bilas tabung vial dengan 2 mL CH₂Cl₂ dan tambahkan pembilas ke dalam kolom;
- i) sentrifus kumpulan kolom di atas tersebut dengan kecepatan 1 000 rpm selama 2 menit;
- j) buang cairan (supernatan) dalam tabung uji;
- k) dengan cara yang sama seperti di atas, cuci kolom dengan 10 mL toluene – aseton (dengan rasio 80 : 20);
- l) buang cairan tersebut;
- m) masukan kolom ke dalam tabung uji yang bersih;
- n) elusi larutan DON dari kolom dengan 8 mL CH₂Cl₂ – metanol (dengan rasio 95 : 5);
- o) secara kuantitatif pindahkan eluat ke 4 buah tabung vial dan pekatkan untuk pengeringan dalam alat blok pemanas pada temperatur 60 °C di bawah hembusan nitrogen;
- p) residu akhir mewakili 2 g porsi uji.

A.10.4.3 Prosedur derivatisasi**A.10.4.3.1 Derivatisasi contoh uji**

- Pindahkan larutan stok DON sebanyak 10 μL ke dalam 3 tabung vial dan uapkan sampai kering;
- perlakukan residu yang berasal dari prosedur pencucian kolom (A.10.4.2) dan larutan standard (larutan stok DON) dengan cara yang sama;
- pindahkan larutan katalis 4-DMAP sebanyak 1,0 mL ke dalam tabung vial dan tambahkan 50 μL asam heptafluorobutirat anhidrat (AHFBA);
- tutup vial rapat-rapat dan panaskan di dalam blok pemanas pada temperatur 60 °C selama 20 menit;
- biarkan campuran reaksi yang terderivatisasi dingin pada temperatur ruang;
- tambahkan larutan NaHCO_3 3% sebanyak 1,0 mL ke dalam vial;
- lalu kocok selama 2 menit dan biarkan sampai terbentuk lapisan terpisah secara sempurna;
- pindahkan lapisan atas (fase organik) sebanyak 100 μL dengan alat suntik 2 tabung vial berisi 900 μL heksana;
- konsentrasi akhir dari larutan standard digambarkan sebagai DON yang ekuivalen sebagai berat/ μL , yaitu 0,1 ng/ μL ;
- konsentrasi akhir larutan uji, digambarkan sebagai analit yang tak terderivatisasi yang ekuivalen dengan berat/ μL , yaitu 0,000 2 g/ μL .

A.10.4.4 Kromatografi gas

Analisis kromatografi gas harus dilakukan dengan hari yang sama dengan proses derivatisasi.

A.10.4.4.1 Kondisi-kondisi pengoperasian

- Gas pembawa, $\text{CH}_4\text{-Ar}$ (dengan rasio 5 : 95);
- laju alir 60 mL/menit;
- kecepatan penggambaran grafik 0,5 cm/menit;
- diseting atenuasi untuk memberikan FSD 10 % untuk 10 piko gram standard;
- port injeksi 200 °C;
- program temperatur : temperatur awal 175 °C;
- waktu awal 10 menit;
- laju program 10 °C/menit;
- temperatur akhir 250 °C;
- waktu akhir 5 menit.

A.10.4.4.2 Kurva standar

- Injek standar DON yang terderivatisasi sebanyak 1 μL – 5 μL secara langsung ke dalam untuk memperoleh respon puncak;
- buat kurva standar dengan memplotkan jumlah DON yang terderivatisasi vs respon detektor untuk rentang 100 piko gram – 500 piko gram;
- respon detektor (area puncak) untuk rentang 100 piko gram – 500 piko gram secara linear;
- waktu retensi untuk derivatif DON dalam kondisi ini adalah sekitar 6,5 menit.

A.10.4.4.3 Determinasi

Injek larutan uji dari prosedur derivatisasi contoh uji (A.10.4.3.1) sebanyak 2 µL ke dalam alat kromatografi gas dalam kondisi yang sama yang digunakan untuk menyiapkan kurva standar.

A.10.5 Perhitungan

Hitung jumlah DON dalam contoh uji dengan membandingkan area puncak dari larutan uji dengan area puncak dari standar DON yang terderivatisasi dengan formula sebagai berikut:

$$\text{DON, ng/g} = (C'/C) \times (V'/V) \times (PA/PA')$$

Keterangan:

- C' adalah konsentrasi dari standard DON, dinyatakan dalam nanogram per mikroliter (ng/µL);
- V' adalah volume dari standard DON yang diinjeksikan, dinyatakan dalam mikroliter (µL);
- PA adalah area puncak dari larutan uji yang diinjeksikan;
- PA' adalah area puncak dari standard;
- C adalah konsentrasi larutan uji, dinyatakan dalam 0,0002 gram per mikroliter (g/µL), jika digunakan 25 g porsi uji);
- V adalah volume dari larutan uji yang diinjeksikan, dinyatakan dalam mikroliter (µL).



Bibliografi

- AOAC Official Method 925.11., Ash of Macaroni Products.
- AOAC Official Method 926.07. Solids (Total) and Loss on Drying (Moisture) in Macaroni Products, Air Oven Method.
- AOAC Official Method 930.25. Protein in Macaroni Products.
- AOAC Official Method 931.08. Formaldehyde in Food.
- AOAC Official Method 970.33, Boric Acid and Borates in Food.
- AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method.
- AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method.
- AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method.
- AOAC Official Method 986.18, Deoxynivalenol in Wheat, Gas Chromatographic Method.
- AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing.
- AOCS Official Method Ba 5b-68. Acid-Insoluble Ash.
- ISO 6579: 2002, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. 4th Edition.
- ISO 4833:2003. Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30 °C.